

ROLA METALOPROTEINAZ MACIERZY POZAKOMÓRKOWEJ W NOWOTWORACH PIERSI, ZE SZCZEGÓLNYM UWZGLĘDNIENIEM ROLI ŻELATYNAZY A ORAZ ŻELATYNAZY B

THE ROLE OF MATRIX METALLOPROTEINASES
IN BREAST CANCER, WITH PARTICULAR
ROLE OF GELATINASE A AND GELATINASE B

Anna ŁAPKA, Anna GOŹDZIAŁSKA, Jerzy JAŚKIEWICZ

Zakład Analityki Biochemicznej, Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Analityki
Medycznej Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków

Streszczenie: Metaloproteinazy macierzy pozakomórkowej (MMPs) są enzymami bezpośrednio zaangażowanymi w procesy tworzenia przerzutów nowotworowych. W warunkach fizjologicznych MMPs uczestniczą w takich procesach, jak: embriogeneza, angiogeneza, cykliczne zmiany w endometrium, gojenie ran oraz agregacja płytek. Zmiany aktywności tych enzymów obserwowano w wielu procesach patologicznych, takich jak: choroba nowotworowa, procesy zapalne oraz choroby degeneracyjne układu nerwowego. W procesach nowotworowych MMPs uczestniczą w regulacji wzrostu i proliferacji komórek, tworzeniu przerzutów, angiogenezie oraz w odpowiedzi immunologicznej organizmu. Szczególnie ważną rolę odgrywają żelatynaza A (MMP-2) oraz żelatynaza B (MMP-9). Są to enzymy mające największą zdolność do degradacji kolagenu typu IV będącego głównym składnikiem błony podstawnej (BM). Utrata ciągłości w strukturze BM warunkuje zapoczątkowanie procesu migracji komórek nowotworowych z pierwotnego guza i tworzenie przerzutów w miejscach odległych.

Słowa kluczowe: metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej, żelatynaza A, żelatynaza B, nowotwór piersi.

Summary: Matrix metalloproteinases (MMPs) are the enzymes which are directly involved in metastasis. Under physiological conditions MMPs are involved in such processes as embryogenesis, angiogenesis, cyclic changes in endometrium, wound healing and platelet aggregation. There is evidence that MMPs activity changes in many pathological conditions, including tumor disease, inflammatory and the degenerative diseases of nervous system. In cancer MMPs regulate growth and cancer-cell proliferation, metastasis, angiogenesis and the immune response to cancer. Gelatinase A (MMP-2) and gelatinase B (MMP-9) play an important role in cancer, because of their ability to degrade type IV collagen. The collagen type IV is the major component of basement membrane (BM). Loss of the continuity in BM structure determines the beginning of the cancer cell migration from primary tumor and creation of remote metastasis.

Key words: matrix metalloproteinases, gelatinase A, gelatinase B, breast cancer.

WSTĘP

Rak gruczołu piersiowego jest obecnie najczęściej występującym nowotworem u kobiet. W Stanach Zjednoczonych oraz krajach Unii Europejskiej rocznie na raka piersi zapada 6–7 proc. kobiet. W Polsce nowotwór ten stanowi około 19 proc. ogółu rejestrowanych nowotworów złośliwych u kobiet i zajmuje pierwsze miejsce pod względem zachorowalności oraz umieralności z powodu nowotworów [45].

Diagnoza zmian nowotworowych opiera się głównie na zastosowaniu metod histopatologicznych i obrazowych. Inną jeszcze metodą wykrywania zmian nowotworowych jest oznaczanie markerów nowotworowych w krwi [14, 21]. Ze względu na fakt, że rozwój choroby nowotworowej poprzedza mutacja określonych genów, poszukuje się obecnie metod, które pozwoliłyby na wykrycie komórek transformowanych nowotworowo. Innym jeszcze kierunkiem badań mogą być oznaczenia stabilności macierzy tkanek, w których rozwijają się zmiany nowotworowe. Wszystkie te działania prowadzą do wykrycia przedprzerzutowego stadium zmian nowotworowych. Wczesne wykrywanie komórek transformowanych nowotworowo umożliwia wdrożenie takich metod terapeutycznych, które zwiększają prawdopodobieństwo wyleczenia lub wydłużają czas przeżycia [16, 39].

Rak piersi charakteryzuje się dużą inwazyjnością poprzez wczesną migrację komórek nowotworowych drogą naczyń krwionośnych i limfatycznych. Ogniska przerzutów najczęściej wykrywane są w płucach, kościach, wątrobie oraz mózgu [23, 34]. Nabycie przez komórkę nowotworową fenotypu inwazyjnego warunkuje inicjację procesu migracji do otaczających tkanek, a tym samym możliwość tworzenia przerzutów. Aktywacja tego procesu zależy od przebiegających równolegle dwóch procesów, a mianowicie utraty połączeń pomiędzy komórkami guza i degradacji białek macierzy pozakomórkowej (ECM – *extracellular matrix*) [13, 21, 35].

Pierwszym etapem procesu migracji jest pokonanie bariery, jaką stanowi macierz pozakomórkowa oraz błona podstawna (BM – *basement membrane*) [8, 14].

W warunkach fizjologicznych macierz pozakomórkową tworzą specyficzne białka. Wśród tych związków wyróżnia się białka kolagenowe oraz elastynę, a także specyficzne glikoproteiny, proteoglikany i glikozaminoglikany [8]. Skład i proporcje tych związków są charakterystyczne dla poszczególnych tkanek oraz wyznaczają ich strukturę i funkcję. Kolageny oraz elastyna tworzą rusztowanie ECM, zapewniając tym samym zachowanie prawidłowej struktury tkanki oraz transdukcję sygnałów międzykomórkowych [30, 31, 42]. Błona podstawna, będąca jedną z form ECM, utworzona jest głównie przez białko kolagenowe typu IV, fibronektynę, lamininę, entaktynę oraz siarczan heparanu [7, 30]. Glikoproteiny biorą udział w adhezji, migracji oraz różnicowaniu się komórek poprzez wiązanie z integrzynami. Proteoglikany występujące w ECM ułatwiają migrację komórek [8].

Zaburzenie funkcji macierzy pozakomórkowej oraz błony podstawnej poprzez patogenne działanie metaloproteinaz jest procesem warunkującym tworzenie przerzutów. Równolegle w zmienionej nowotworowo tkance zachodzi aktywnie proces angiogenezy. Destrukcja macierzy tkankowej oraz angiogeneza to etapy rozwoju zmian nowotworowych umożliwiające migrację komórek z następowym tworzeniem przerzutów [21].

1. CHARAKTERYSTYKA BIOCHEMICZNA ORAZ BUDOWA METALOPROTEINAZ

Enzymy hydrolizujące białka macierzy są zaliczane do klasy endopeptydaz. W piśmiennictwie bywają określane jako proteinazy lub proteazy. Obecna klasyfikacja metaloproteinaz wyszczególnia 25 odrębnych enzymów, a z grupy tej 22 występuje u ludzi [8, 38]. Enzymy te ze względu na specyfikę substratową oraz budowę zostały podzielone na 8 grup, a mianowicie: kolagenazy, żelatynazy, stromielizyny, matrylizyny, enamelizyny, metaloelastazy, metaloproteinazy błonowe oraz pozostałe, niezaklasyfikowane do żadnej z wyżej wymienionych grup (tab. 1). W tabeli podano także poznane substraty dla poszczególnych grup enzymów. Substratami są białka macierzy pozakomórkowej, w tym białka kolagenowe, laminina, fibronektyna, elastyna oraz proteoglikany [8, 34]. Podobieństwo enzymów o tej samej specyfice substratowej potwierdzone jest homologią domen tych enzymów [38].

Synteza MMPs w warunkach prawidłowych zachodzi w komórkach macierzy współtworzącej określoną tkankę łączną, w tym również w komórkach krwi. W warunkach patogenicznych MMPs są ponadto syntetyzowane przez komórki nowotworowe. We wszystkich przypadkach MMPs produkowane są jako preproenzymy, a większość z nich wydzielana jest do ECM w postaci nieczynnych proenzymów. Istnieje możliwość wewnątrzkomórkowej aktywacji MMPs, jak ma to miejsce w przypadku MMP-14, której proces aktywacji zachodzi w aparacie Golgiego [8, 10, 38]. Funkcja aktywnych form MMPs zależy od pH i jest największa w pH obojętnym. Aktywność przemian uczynniania zależna jest także od stężenia jonów Ca^{2+} oraz Zn^{2+} [8, 10, 26].

2. FUNKCJA METALOPROTEINAZ W WARUNKACH FIZJOLOGICZNYCH

W warunkach prawidłowych metaloproteinazy biorą udział w regulacji rozwoju płodowego oraz procesach wzrostu i przebudowy tkanek. Odpowiedzialne są także za cykliczne zmiany w endometrium oraz zmiany zachodzące podczas ciąży, porodu i połogu [38]. Uczestniczą w procesach angiogenezy, a także migracji komórek odpowiedzi zapalnej biorąc udział w procesach gojenia ran oraz tworzenia blizn [33, 38]. MMP-2 odgrywa istotną rolę w regulacji czynności płytek krwi poprzez stymulację agregacji niezależną od tromboksanu A_2 (TXA_2). Natomiast MMP-9 hamuje proagregacyjne działanie MMP-2. Antagonistyczne działanie MMP-2 i MMP-9 stanowi jeden z mechanizmów pozwalających na utrzymanie hemostazy naczyniowej [33].

2a. Budowa i charakterystyka MMP-2 oraz MMP-9

Metaloproteinaza MMP-2, zwana żelatynazą A lub kolagenazą 72 kDa oraz MMP-9, określana też jako żelatynaza B lub kolagenaza 92 kDa, mają domeny wspólne dla całej grupy MMPs, a także domeny charakterystyczne, stanowiące o ich odmiennych

TABELA 1. Specyfika substratowa metaloproteinaz macierzy pozakomórkowej [7]

Grupa enzymów	MMP	Substraty
Kolagenazy		
Kolagenaza 1	MMP-1	kolagen typu I, II, III, VII, VIII, X, XI, żelatyna, agrekan, entaktyna, fibronektyna, laminina, tenascyna, vitronektyna, $\alpha 1$ -antychymotrypsyna, $\alpha 2$ -makroglobulina, fibryna, fibrynogen, pro-MMP-2, pro-MMP-9, pro-TNF α
Kolagenaza 2	MMP-8	kolagen typu I, II, III, agrekan, $\alpha 2$ -makroglobulina, fibrynogen
Kolagenaza 3	MMP-13	kolagen typu I, II, III, IV, VI, IX, XIV, żelatyna, agrekan, fibronektyna, tenascyna, $\alpha 2$ -makroglobulina, kazeina, czynnik XII, fibrynogen, pro-MMP-9
Kolagenaza 4	MMP-18	kolagen typu I, żelatyna
Żelatynazy		
Żelatynaza A	MMP-2	kolagen typu I, II, III, IV, VII, IX, X, XI, żelatyna, agrekan, elastyna, entaktyna, fibronektyna, IGFBP, laminina, tenascyna, vitronektyna, fibryna, fibrynogen, pro-MMP-9, pro-MMP-13, plazminogen, pro-TNF α
Żelatynaza B	MMP-9	kolagen typu IV, V, XI, XIV, żelatyna, agrekan, dekoryna, elastyna, IGFBP, laminina, vitronektyna, $\alpha 2$ -makroglobulina, endotelina, kazeina, fibryna, fibrynogen, IL1 β , pro-MMP-2, plazminogen, pro-TNF α
Stromielizyny		
Stromielizyna 1	MMP-3	kolagen typu III, IV, V, VII, IX, X, XI, żelatyna, agrekan, dekoryna, elastyna, entaktyna, fibronektyna, IGFBP, laminina, osteonektyna, perlekan, tenascyna, vitronektyna, $\alpha 1$ -antychymotrypsyna, $\alpha 2$ -makroglobulina, kazeina, E-kadheryna, fibryna, fibrynogen, IL-1 β , pro-MMP-1, pro-MMP-7, pro-MMP-8, pro-MMP-9, pro-MMP-13, pro-TNF α
Stromielizyna 2	MMP-10	kolagen typu III, IV, V, żelatyna, agrekan, elastyna, fibronektyna, kazeina, fibrynogen, pro-MMP-1, pro-MMP-7, pro-MMP-8, pro-MMP-9
Stromielizyna 3	MMP-11	IGFBP, $\alpha 2$ -makroglobulina
Matrylizyny		
Matrylizyna	MMP-7	kolagen typu I, IV, żelatyna, agrekan, dekoryna, elastyna, entaktyna, fibronektyna, laminina, tenascyna, vitronektyna, kazeina, E-kadheryna, fibrynogen, pro-MMP-1, pro-MMP-2, pro-MMP-9, plazminogen, pro-TNF α
Matrylizyna 2	MMP-26	kolagen typu IV, żelatyna, fibrynogen, fibronektyna, vitronektyna, kazeina, pro-MMP-9
Enamelizyna	MMP-20	agrekan
Metalocelastaza	MMP-12	kolagen typu I, IV, żelatyna, agrekan, elastyna, entaktyna, fibronektyna, laminina, vitronektyna, czynnik XII, $\alpha 2$ -makroglobulina, fibrynogen, IgG, plazminogen, pro-TNF α
Metaloproteinazy błonowe		
MT1-MMP	MMP-14	kolagen typu I, II, III, żelatyna, agrekan, entaktyna, fibronektyna, perlekan, vitronektyna, $\alpha 2$ -makroglobulina, CD44, czynnik XII, fibryna, fibrynogen, αv integryna, pro-MMP-2, pro-MMP-13, tenascyna, pro-TNF α
MT2-MMP	MMP-15	agrekan, entaktyna, fibronektyna, laminina, perlekan, tenascyna, pro-MMP-2
MT3-MMP	MMP-16	kolagen typu III, żelatyna, kazeina, fibronektyna, pro-MMP-2
MT4-MMP	MMP-17	żelatyna, fibryna, fibrynogen, pro-MMP-2, pro-TNF α
MT5-MMP	MMP-24	żelatyna, fibronektyna, pro-MMP-2
MT6-MMP	MMP-25	kolagen typu IV, żelatyna, fibronektyna, fibrynogen, fibryna, pro-MMP-2

właściwościach. W obrębie domeny katalitycznej MMP-2 i MMP-9 występują trzy powtórzone fragmenty podobne do fibronektyny. Fragmenty te odpowiedzialne są za wiązanie z substratem, jakim jest kolagen i elastyna oraz innymi substratami, które zostały zestawione w tabeli 1 [1, 9, 36]. Ponadto MMP-9 w obrębie regionu zawiasowego ma domenę kolagenu typu V o niepoznanej dotychczas funkcji [8, 38].

W cząsteczce MMPs występuje sekwencja sygnałowa, a także domena katalityczna z centrum aktywnym oraz domena hemopeksynopodobna zakończona grupą karboksylową [8, 31]. Sekwencję sygnałową tworzą aminokwasy N-końca cząsteczki, które decydują o sekrecji proenzymu z siateczki endoplazmatycznej do macierzy zewnątrzkomórkowej. Propeptyd zbudowany jest z sekwencji PRCG(X)PDV (Pro- Arg- Cys- Gly- (X)- Pro- Asp- Val) i zawiera ok. 80 aminokwasów [24]. Wśród aminokwasów szczególną rolę odgrywa cysteina, której reszta wiążąc atom cynku utrzymuje tym samym enzym w stanie nieaktywnym. Domena katalityczna, zbudowana z ok. 170 aminokwasów, zawiera centrum aktywne, o tylko częściowo poznanej sekwencji HEXXHXXGXXH [24, 38]. Trzy cząsteczki histydyny, obecne w domenie katalitycznej wiążą atom cynku [8, 24]. Równoczesne wiązanie atomu cynku przez reszty histydyny z domeny katalitycznej i resztę cysteiny z sekwencji sygnałowej czyni kompleks białkowy nieaktywnym. Rozerwanie połączenia cysteiny z sekwencją sygnałową jest wstępnym procesem prowadzącym do uaktywnienia enzymu.

3. REGULACJA AKTYWACJI I INHIBICJI MMP-2 ORAZ MMP-9

Prawidłowa ekspresja MMPs regulowana jest na poziomie transkrypcji genów, translacji, aktywacji proenzymów oraz poprzez aktywatory i inhibitory tkankowe (TIMPs – *tissue inhibitors of metalloproteinases*) [8, 27, 36, 38]. W warunkach patologicznych wzrost ekspresji metaloproteinaz jest spowodowany głównie zaburzeniami regulacji transkrypcji. Pierwszym etapem tych przemian jest zmiana funkcji protoonkogenów w onkogeny. Szczególna rola przypada na protoonkogeny fos i jun. Mutacja w obrębie tych genów często prowadzi do wystąpienia nowotworów [21, 22]. Białka Fos i Jun łączą się w czynnik transkrypcyjny AP-1. Czynnik ten ma zdolność tworzenia połączeń z promotorami genów MMP-2 oraz MMP-9, a także wielu innych MMPs [15, 27, 38]. W regulacji poziomu ekspresji MMP-2 bierze także udział onkogen HER2/neu (zwany również c-erbB-2) oraz czynnik transkrypcyjny AP-2 [17, 22].

Onkogen HER-2/neu jest genem kodującym błonowy receptor dla kinazy tyrozynowej, zawierający sekwencje homologiczne z receptorem dla epidermalnego czynnika wzrostu (EGF – *epidermal growth factor*) [17, 22]. Białko HER-2/neu ma aktywność kinazy tyrozynowej, co powoduje pobudzenie sygnału mediowanego receptorem nawet przy braku ligandu. Nadekspresja tego białka obserwowana jest u 20–30% kobiet chorych na nowotwory piersi i najczęściej wynika z amplifikacji genu HER-2/neu [5, 17, 22]. Nadmierna ekspresja genu HER-2/neu, która została potwierdzona w nowotworach gruczołu sutkowego prowadzi do wzrostu aktywności MMP-2.

Czynnik transkrypcyjny AP-2 jest białkiem, którego znaczenie zostało potwierdzone w procesach wzrostu, różnicowania oraz apoptozy komórek [22, 40]. Odgrywa zasadniczą rolę w procesach nowotworowych. Wiąże się z regionem promotorowym protoonkogenu *HER-2/neu* aktywując jego ekspresję [22]. Dodatkowo czynnik transkrypcyjny AP-2 odgrywa znaczną rolę w procesie transkrypcji *MMP-2* oraz odpowiada za zwiększenie aktywności obszaru promotorowego genu *MMP-9*. Efekt wpływu nadekspresji genu *HER2/neu* na zdolność komórek nowotworowych do tworzenia przerzutów jest zatem związany ze zwiększeniem poziomu ekspresji *MMP-2* oraz *MMP-9*, a także ze wzrostem aktywności proteolitycznej tych enzymów [16, 27].

Wzrost poziomu ekspresji *MMPs* może być także wynikiem spadku poziomu ekspresji genów supresorowych, których produkty białkowe, w prawidłowych warunkach, hamują wzrost i proliferację komórek. Najczęściej występującą mutacją genów supresorowych w raku piersi jest mutacja genu *p53*. Jest to gen, którego białkowy produkt, wiążąc się z DNA kontroluje proces syntezy DNA, transkrypcji oraz apoptozę. W dziedzicznych nowotworach piersi najczęściej obserwowanymi mutacjami są mutacje genów *BRCA-1* i *BRCA-2*. Białka kodowane przez geny *BRCA-1* i *BRCA-2* są białkami jądrowymi. Ich funkcja nie została dokładnie poznana, natomiast prawdopodobnie biorą udział w procesach naprawy DNA i regulacji transkrypcji. Mutacja genu kodującego E-kadherynę powodująca spadek ekspresji tego białka prowadzi do zmniejszenia kohezji międzykomórkowej. Ułatwia to inwazyjność oraz tworzenie przerzutów w nowotworach piersi, raku jelita grubego, przełyku, jajnika [21, 37]. Mutacje genów kodujących poszczególne enzymy są rzadko wykrywane [8, 32, 38].

Ekspresja genów *MMPs* regulowana jest przez wiele czynników stymulujących oraz hamujących. Do czynników stymulujących ekspresję należą między innymi estry forboleu, białka macierzy zewnątrzkomórkowej, stres komórkowy oraz cytokiny [8, 20, 38]. Czynniki wzrostu, w tym interleukiny, interferon, EGF, FGF, VEGF, PDGF, TNF- α , TGF- β to również ważne regulatory ekspresji *MMPs* [13, 28, 36]. Innym jeszcze czynnikiem pobudzającym *MMPs* są białka komórek nowotworowych. Przykładem jest cząsteczka białka EMMPRIN (*extracellular matrix metalloproteinase inducer*), glikoproteina, zlokalizowana na powierzchni komórki nowotworowej [2, 24]. Białko to stymuluje znajdujące się w bliskim sąsiedztwie fibroblasty do produkcji metaloproteinaz, w tym *MMP-2*. Poprzez aktywację *MMP-2* białko EMMPRIN pobudza proteolizę ECM. Obecność EMMPRIN została stwierdzona na powierzchni komórek nowotworowych guzów piersi, płuc, przewodu pokarmowego, pęcherza moczowego, a także komórek czerniaka [24].

MMP-2 oraz *MMP-9*, tak jak pozostałe enzymy tej grupy, wydzielane są do środowiska pozakomórkowego w postaci nieaktywnego biologicznie proenzymu (pro-*MMPs*). Aktywacja pro-*MMPs* do aktywnej *MMPs* zachodzi w środowisku zewnątrzkomórkowym, ale związana jest z funkcją komórki [10, 29]. Do pełnej aktywacji latentnej formy enzymów konieczny jest proces proteolityczny, tzw. *cysteine-switch*. Efektem jest odcięcie N-terminalnego propeptydu bogatego w cysteinę, a w następstwie odsłonięte zostaje centrum aktywne z trzema resztami histydyny oraz jonem cynku (Zn^{2+}) [1, 40]. Mechanizm aktywacji zachodzi poprzez rozerwanie wiązań pomiędzy grupą tiolową cysteiny a jonem cynku [38]. Odłączenie propeptydu maskującego miejsce

aktywne zawierające Zn^{2+} powoduje skrócenie łańcucha aminokwasowego oraz zmniejszenie masy cząsteczkowej o ok. 10 kDa [10, 38].

Efektywna aktywacja pro-MMP-2 może nastąpić w drodze zależnej od MMP-14 (MT1-MMP) oraz niezależnie od działania tego enzymu. MMP-14 to metaloproteinaza transbłonowa, której cząsteczka jest związana z błoną komórkową komórek tkanki łącznej. Aktywacja MMP-2 poprzez szlak zależny od MMP-14 wymaga powstania kompleksu tego enzymu z MMP-14 i TIMP-2 na powierzchni błony komórkowej [24, 40]. Działanie MMP-14 polega na rozerwaniu wiązania pomiędzy Asn^{37} - Leu^{38} w cząsteczce pro-MMP-2. Dalsze przekształcenie polegające na rozerwaniu wiązania pomiędzy Asn^{80} - Tyr^{81} jest procesem autokatalitycznym. Proces aktywacji MMP-2 może także zachodzić wskutek interakcji pomiędzy metaloproteinazą błonową MMP-14 oraz integryną $\alpha v \beta 3$. Cząsteczki integryny obecne są w komórkach śródbłónka oraz w komórkach nowotworowych różnych tkanek, w tym także w tkankach nowotworowych piersi. Integryna $\alpha v \beta 3$ odgrywa krytyczną rolę w procesach wzrostu nowotworu i tworzenia nowych naczyń krwionośnych. Interakcja pomiędzy hemopeksy-nopodobną, C-końcową domeną MMP-2 a integryną $\alpha v \beta 3$ umożliwia efektywne dojrzewanie MMP-2. Sama integryna zatem aktywuje MMPs, lecz w połączeniu z vitronektyną specyficznie wiążąca się z integryną, blokuje proces aktywacji proMMP-2, prowadząc tym samym do spadku poziomu aktywnych form MMP-2 [4].

Kolejny mechanizm aktywacji metaloproteinaz może dokonywać się pod wpływem proteinaz serynowych, obecnych w środowisku pozakomórkowym, takich jak: trypsyna, proteinazy systemu aktywacji plazminogenu do plazminy, elastaza leukocytarna oraz katepsyna G. Trypsyna w takich warunkach wydzielana jest przez komórki nowotworowe [33]. Aktywacja dokonuje się także przy udziale aktywnych form metaloproteinaz [38]. Zwiększenie ekspresji oraz aktywacji MMPs w procesach nowotworowych prowadzi do wielokrotnienia efektu destrukcji macierzy, a zatem widoczny jest tu typowy mechanizm reakcji kaskadowej.

W wyniku działania związków nieorganicznych, takich jak cyjanek lub jodek potasu, siarczan dodecyłu sodu oraz związków organicznych zawierających rtęć, a także mocznika i stresu oksydacyjnego, będących niespecyficznymi aktywatorami MMPs zachodzą zmiany konformacyjne w obrębie cząsteczki pro-MMP. Zmiany te prowadzą w efekcie do odłączenia peptydu regulatorowego i aktywacji proenzymu [10, 33].

W warunkach prawidłowych głównymi inhibitorami metaloproteinaz są tkankowe inhibitory metaloproteinaz TIMP, stanowiące grupę specyficznych inhibitorów MMPs. Są to białka o masie cząsteczkowej pomiędzy 20–29 kDa, które łączą się wiązaniami niekowalencyjnymi z MMP w stosunku stechiometrycznym 1:1 [3, 36, 38, 41]. Kompleks taki może ulec dysocjacji z odzyskaniem pełnej aktywności TIMPs oraz MMPs [9]. Dotychczas poznano i scharakteryzowano cztery geny, które kodują białka TIMP-1, 2, 3 oraz 4. Skład i sekwencja aminokwasowa wszystkich TIMPs jest podobna w 37–51%. Wszystkie zawierają w swej strukturze 12 reszt cysteinowych, które tworzą 6 mostków disiarczkowych oraz 6 pętli polipeptydowych [10, 19, 38]. Pętla 1–3 znajdują się w C-końcowym fragmencie struktury, natomiast pętla 4–6 znajdują się we fragmencie N-końcowym białka [10, 36]. Obie domeny N- i C-końcowa mają zdolność do tworzenia

połączeń z MMPs, natomiast największa aktywność inhibicyjna związana jest głównie z możliwością tworzenia wiązań pomiędzy N-końcem TIMP a N-końcem enzymu. Aktywność inhibicyjna poszczególnych białek TIMP jest różna w stosunku do różnych MMPs. Domena C-końcowa (pętla 4–6) TIMP-1 ma większe powinowactwo do domeny hemopeksynopodobnej MMP-9 niż do domeny hemopeksynopodobnej MMP-2. C-końcowa domena TIMP-2 ma natomiast znacznie większe zdolności do wiązania z domeną hemopeksynopodobną MMP-2 [9, 10, 25]. Paradoksalnie TIMP-2 ma działanie nie tylko inhibicyjne, ale również bierze udział w procesie aktywacji MMP-2 przy udziale MMP-14. TIMP-3 wykazuje znacznie większe powinowactwo w stosunku do MMP-9 niż pozostałe białkowe inhibitory [10, 38]. Białka TIMPs oprócz inhibicji metaloproteinaz mają także zdolność pobudzania wzrostu komórek, a także supresji sygnałów prowadzących do pobudzenia mitozy oraz apoptozy [38].

Do endogennych inhibitorów metaloproteinaz należy także trombospodyna-2, trombospodyna-1, niewielkie cząsteczki białkowe z fragmentami homologicznymi do TIMPs, inhibitor związany z błoną komórkową RECK (*reversion-inducing cysteine-rich protein with kazal motifs*) oraz α 2-makroglobulina, będąca białkiem osoczym. Bierze ona udział w nieodwracalnej inhibicji MMPs [8, 27].

Zmniejszenie aktywności MMPs możliwe jest także na etapie transkrypcji, poprzez zablokowanie odcinków DNA, które kodują poszczególne enzymy. Zmniejszenie aktywności może też odbywać się poprzez zablokowanie aktywnych już form enzymów.

4. PRZEBUDOWA MACIERZY POZAKOMÓRKOWEJ

Aby komórki rakowe mogły pokonać gęstą sieć elementów budujących macierz zewnątrzkomórkową, niezbędna jest proteoliza poszczególnych składników tego środowiska. Szczególna rola w procesie proteolizy składników ECM związana jest z aktywnością metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej. Szczególne znaczenie dla zagrożenia migracją komórek ma proteolityczne działanie MMPs na E-kadherynę, białko adhezyjne, które uczestniczy w interakcji pomiędzy komórkami. Cząsteczka E-kadheryny zlokalizowana jest na powierzchni komórek nabłonkowych. Degradacja białka prowadzi do zaburzenia oddziaływań międzykomórkowych, a także inicjuje proces transformacji komórek nabłonkowych w komórki mezenchymatyczne. Taka zmiana fenotypu komórkowego związana jest ze stopniem zaawansowania oraz złośliwością nowotworu. [8, 14, 38]. Żelatynaza A (MMP-2) oraz żelatynaza B (MMP-9) mają największe zdolności do degradacji białka kolagenowego typu IV, będącego głównym składnikiem błony podstawnej [42]. MMP-2 ulega ekspresji w bardzo wczesnej fazie raka piersi i jest traktowana, jako jeden z pierwszych czynników umożliwiających formowanie się nowotworu. W większości przypadków jest nieobecna w normalnej dorosłej tkance piersi, ale ulega ekspresji w łagodnych nowotworach, takich jak np. włókniaki [35]. Uszkodzenia struktury błony podstawnej stanowią jeden z elementów warunkujących migrację komórek. Metaloproteinazy te odgrywają krytyczną rolę w procesie transformacji nowotworu *in*

situ w jego postaci inwazyjną. Wzrost ekspresji MMPs głównie MMP-2 oraz MMP-9 odpowiedzialnych za degradację kolagenu typu IV został stwierdzony w tkankach nowotworowych tych nowotworów piersi, których komórki mają zdolność do tworzenia przerzutów. Natomiast wzrost ekspresji enzymów nie został potwierdzony w tkance nowotworowej *in situ* [7, 12]. Ekspresja MMP-2 zachodzi głównie w zrębie złośliwych nowotworów i jest zwiększana przez parakrynnne pobudzanie mediowane przez czynniki rozpuszczalne. Dla odmiany ekspresja MMP-9 w fibroblastach pochodzących z tkanki nowotworowej wymaga bezpośredniego kontaktu ze złośliwym nabłonkiem nowotworowym [35].

5. ROLA METALOPROTEINAZ MMP-2 ORAZ MMP-9 W PROCESACH NOWOTWOROWYCH

Dotychczas rola metaloproteinaz w procesach nowotworowych ograniczona była jedynie do udziału w inwazji i tworzeniu przerzutów. Jednak wykazano także działania MMPs na innych etapach karcinogenezy.

5a. MMPs a procesy wzrostu i apoptozy komórek nowotworowych

MMPs regulują procesy wzrostu oraz proliferacji komórek. W prowadzonych badaniach doświadczalnych wykazano, iż proliferacja komórek nowotworowych u myszy, które nie miały genu kodującego MMP-9 była w znacznym stopniu zahamowana [8].

MMPs generują sygnały pobudzające komórki do intensywnego namnażania się, uwalniają związane z błoną komórkową prekursorzy czynników wzrostu, np. TGF- α . Rozkładają kompleks IGF-BP (*insulin-like growth factor-binding protein*), uwolniony zostaje czynnik IGF, który pobudza wzrost komórek nowotworowych. MMP-9 obniża także zdolność komórek nowotworowych do apoptozy [7, 8].

5b. MMPs a tworzenie przerzutów

Rola MMPs w procesach tworzenia przerzutów jest znana już od kilku lat. Potencjał inwazyjny nowotworu może być zależny od interakcji pomiędzy MMPs a TIMPs. Przewaga aktywności enzymów nad ich tkankowymi inhibitorami prowadzi do zwiększenia potencjału inwazyjnego [22]. Pierwszym krokiem jest migracja komórek nowotworowych do otaczających tkanek, a następnie do tkanek znacznie oddalonych od miejsca pierwotnego guza [6, 3]. Aby proces ten mógł zaistnieć, niezbędne jest zmniejszenie adhezyjności komórek nowotworowych do podłoża. Dochodzi do tego na skutek degradacji białek adhezyjnych, w tym E-kadheryny przez metaloproteinazy [8, 38]. MMP-2 oraz MMP-14 degradują lamininę-5 w błonie podstawnej. W wyniku tego działania odsłonięciu ulega miejsce w strukturze lamininy, które w warunkach fizjologicznych jest ukryte. Ekspozycja tej części białka inicjuje migrację komórek nowotworowych. Podczas wędrówki komórki muszą odłączyć się od sąsiadujących komórek oraz od otaczających je składników macierzy zewnątrzkomórkowej.

Niezbędnym do tego procesu jest lokalizacja MMP-9 na powierzchni błony komórkowej [8]. Na błonie komórek nowotworowych obecne jest białko adhezyjne CD44 będące głównym receptorem dla kwasu hialuronowego. Łączy się także z MMP-9 wiążąc tym samym tę metaloproteinazę na powierzchni komórki nowotworowej. Powstały kompleks sprzyja inwazyjności komórek guza [8, 18]. Kompleks CD44 - MMP-9 rozkładany jest przez MMP-14 i uwolniona zostaje pozakomórkowa domena, co powoduje zmniejszenie inwazyjności nowotworu [8].

5c. MMPs a angiogeneza

Angiogeneza warunkuje lokalny rozwój nowotworów, a także umożliwia tworzenie przerzutów. Zahamowanie procesu angiogenezy prowadzi do supresji wzrostu guza oraz uniemożliwia migrację komórek nowotworowych do innych tkanek [18, 43, 44]. W doświadczeniach *in vitro* wykazano, że endogenne inhibitory MMPs redukują powstawanie nowych naczyń krwionośnych. Nasuwa się zatem wniosek, że MMPs wyraźnie zwiększają możliwości angiogenezy. MMPs degradują składniki ECM, dzięki czemu komórki nabłonkowe przenikają w głąb zrębu nowotworu. Przeprowadzono szereg badań *in vitro* oraz wiele eksperymentów na modelach zwierzęcych, z których wynika, że MMP-2, MMP-9 oraz MMP-14 są bezpośrednimi regulatorami angiogenezy [8, 26]. MMPs degradują kolagen typu IV, I oraz fibronektynę, co powoduje rozluźnienie ścisłej struktury ECM i umożliwia przenikanie komórek nabłonkowych, które dadzą początek nowym naczyniom krwionośnym. Rozkład kolagenu typu IV dodatkowo sprzyja procesowi angiogenezy przez umożliwienie połączenia pomiędzy zdegradowanym kolagenem IV a integryną $\alpha v \beta 3$. Metaloproteinazy zwiększają dostępność proangiogennych czynników wzrostu np. VEGF, FGF-2, TGF- β . Czynniki te stymulują proliferację i migrację komórek nabłonkowych, w wyniku czego dochodzi do organizowania nowych naczyń krwionośnych [8, 21, 44].

5d. MMPs a odpowiedź immunologiczna organizmu

Układ odpornościowy jest zdolny do rozpoznawania i niszczenia komórek nowotworowych poprzez takie komórki, jak: makrofagi, limfocyty T, limfocyty NK i neutrofile. Komórki nowotworowe wykształciły wiele systemów umożliwiających uniknięcie zniszczenia przez układ immunologiczny. Jednym z takich systemów są metaloproteinazy [8]. Istotnym czynnikiem do wzbudzenia reakcji odpornościowej jest proliferacja limfocytów T pod wpływem stymulującego działania kompleksu IL-2- R α (*interleukin-2-receptor- α*). MMPs, a szczególnie MMP-9 mają zdolność do rozkładu tego kompleksu, przez co następuje oczywisty spadek proliferacji limfocytów T, a tym samym znaczące zahamowanie reakcji odpornościowej typu komórkowego [8, 33]. MMPs aktywują również TGF- β (*transforming growth factor*), który jest jednym z inhibitorów odpowiedzi limfocytów T skierowanej przeciwko komórkom nowotworowym [11]. MMP-9 degraduje IL-8 (*interleukin-8*), która jest chemoatraktantem dla fagocytujących komórek. W procesach nowotworowych, w tym także w nowotworach gruczołu piersiowego, pojawiają się komórki zapalne. Komórki te

produkują wiele różnych MMPs, w tym także MMP-9, MMP-12, MMP-14, a zatem pośrednio biorą udział w stymulacji progresji nowotworu i zapewniają komórkom nowotworowym ochronę przed działaniem układu immunologicznego [8].

6. PODSUMOWANIE

Wczesna diagnoza i określenie stanu zaawansowania nowotworu pozwala na zwiększenie przeżywalności chorych na nowotwory piersi. Ważne jest poszukiwanie nowych czynników prognostycznych i diagnostycznych, które umożliwią wczesne wykrycie nowotworów piersi, a jednocześnie pozwolą na wykorzystanie dostępnych możliwości leczenia w postaci chemioterapii, radioterapii lub hormonoterapii obok zabiegu operacyjnego [16, 39]. Wprowadzenie wczesnej diagnozy i skutecznego leczenia staje się misją współczesnej ochrony zdrowia, zwłaszcza w przypadku tak częstego schorzenia, jakim jest rak piersi u kobiet. Uczestnictwo MMP-2 oraz MMP-9 zarówno w angiogenezie, jak i inwazyjności oraz progresji nowotworu i zwiększenie ich ekspresji zgodnie z powiększeniem stopnia zaawansowania nowotworu staje się niekorzystnym czynnikiem prognostycznym [13]. Kobiety, u których w tkance nowotworowej guza piersi stwierdzono zwiększoną ekspresję MMP-2, mają znacznie gorsze rokowania. MMP-9 wykazuje wysoką ekspresję w nowotworze gruczołu piersiowego i wydaje się być związane z tworzeniem przerzutów do węzłów limfatycznych. Głębsze poznanie działania metaloproteinaz zbliża naukę do możliwości odkrycia coraz to nowszych endo- i egzogennych inhibitorów, które zwiększą szansę selektywnego blokowania poszczególnych enzymów, w tym MMP-2 oraz MMP-9.

PIŚMIENNICTWO

- [1] BORKAKOTI N. Structural studies of matrix metalloproteinases. *J Mol Med* 2000; **78**: 261–268.
- [2] CAUDROYL S, POLETTE M, NAWROCKI- RABY B, CAO J, TOOLE BP, ZUCKER S, BIREMBAUT P. EMMPRIN-mediated MMP regulation in tumor and endothelial cells. *Clin Exp Metastasis* 2002; **19**: 697–702.
- [3] CLENDENINN NJ, APPELT K. Matrix metalloproteinase Inhibitors in Cancer Therapy. Totowa, Humana Press 2000.
- [4] DERYUGINA EJ, RATNIKOV B, MONOSOV E, POSTNOVA TJ, DISCIPIO R, SMITH JW, STRONGIN AY. MT1-MMP initiates activation of pro-MMP-2 and integrin $\alpha v \beta 3$ promotes maturation of MMP-2 in breast carcinoma cells. *Exp Cell Res* 2001; **263**: 209–223.
- [5] DEVLIN TM Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations. Fifth Edition Willey-Liss, New York 2002.
- [6] DJONOV V, CRESTO N, AEBERSOLD DM, BURRI PH, ALTERMATT HJ, HRISTIC M, BERDAZ G, ZIEMIECKI A, ANDRES AC. Tumor cell specific expression of MMP-2 correlates with tumor vascularisation in breast cancer. *Int J Oncol* 2002; **21**: 25–30.
- [7] DUFFY MJ, MAGUIRE TM, HILL A, McDERMOTT E, O'HIGGINS N. Metalloproteinases: role in breast carcinogenesis, invasion and metastasis. *Breast Cancer Res* 2000; **2**: 252–257.
- [8] EGBLAD M, WERB Z. New functions for matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev* 2002; **2**: 161–173.

- [9] EMARA M, WOŹNIAK M. Role of metalloproteinases in cancer cell invasiveness. *Diagn Lab* 1999; **35**: 381–397.
- [10] GACKO M. Mechanizmy aktywacji, znaczenie biologiczne i inhibitory metaloproteaz macierzy międzykomórkowej. *Post Hig Med Dośw* 2001; **2**: 303–318.
- [11] GORELIK L, FLAVELL RA. Immune-mediated eradication of tumors through the blockade of transforming growth factor- β signaling in T cells. *Nat Med* 2001; **7**: 1118–1122.
- [12] GRIEU F, QI LI W, IACOPETTA B. Genetic polymorphisms in the MMP-2 and MMP-9 genes and breast cancer phenotype. *Breast Cancer Res Treat* 2004; **88**: 197–204.
- [13] HAGEMAN T, ROBINSON SC, SCHULZ M, TRÜMPER L, BALKWILL F, BINDER C. Enhanced invasiveness of breast cancer cell lines upon co-cultivation with macrophages is due to TNF- α dependent up-regulation of matrix metalloproteinases. *Carcinogenesis* 2004; **25**: 1543–1549.
- [14] HANAHAN D, WEINBERG RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; **100**: 57–70.
- [15] HELMREICH EJM. The Biochemistry of Cell Signalling. Oxford University Press 2001.
- [16] HIRVONEN R, TALVENSAARI-MATTILA, PÄÄKKÖ P, TRUPEENNIEMI-HUJANEN T. Matrix metalloproteinases-2 (MMP-2) in T^{sub1-2}N^{sub0} breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat* 2003; **77**: 85–91.
- [17] HOLBRO T, BEERLI RR, MAURER F, KOZICZAK M, BARBAS CF, HYENS NE. The ErbB2/ ErbB3 heterodimer functions as an oncogenic unit: ErbB2 requires ErbB3 to drive breast tumor cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100**: 8933–8938.
- [18] JOHN A, TUSZYNSKI G. The role of matrix metalloproteinases in tumor angiogenesis and tumor metastasis. *Pathol Oncol Res* 2001; **7**: 14–23.
- [19] KAJITA M i in. Membrane-type 1 matrix metalloproteinase cleaves CD44 and promotes cell migration. *J Cell Biol* 2001; **153**: 893–904.
- [20] KIM JH, LEE KW, LEE MW, LEE HJ, KIM SH, SURH YJ. Hirsutenone inhibits phorbol ester-induced upregulation of COX-2 and MMP-9 in cultured human mammary epithelial cells: NF-kappaB as a potential molecular target. *FEBS Letters* 2006; **580**: 385–392.
- [21] KUMAR V, COTRAN RS, ROBBINS SL. Patologia. wydanie I polskie pod redakcją Włodzimierza T. Olszewskiego, Wydawn. Medyczne Urban & Partner, Wrocław 2005.
- [22] LI M, YINGQUN W, HUNG M-C, KANNAN P. Inefficient proteasomal-degradation pathway stabilizes AP-2 α and activates HER-2/neu gene in breast cancer. *Int J Cancer* 2006; **118**: 802–811.
- [23] MARTINEZ SR, YOUNG SE, GIULIANO AE, BILCHIK AJ. The utility of estrogen receptor, progesterone receptor, and Her-2/neu status to predict survival in patients undergoing hepatic resection for breast cancer metastases. *Am J Surg* 2006; **191**: 281–283.
- [24] NABESHIMA K, INOUE T, SHIMANO Y, SAMESHIMA T. Matrix metalloproteinases in tumor invasion: role for cell migration. *Pathol Int* 2002; **52**: 255–264.
- [25] NAKOPOULOU L, TSIRMPA I, ALEXANDROU P, LOUVROU A et al. MMP-2 protein in invasive breast cancer and the impact of MMP-2/TIMP-2 phenotype on overall survival. *Breast Cancer Res Treat* 2003; **77**: 145–155.
- [26] OH J, TAKAHASHI R, KONDO S, MIZOGUCHI A, ADACHI E, SASAHARA R M, NISHIMURA S, IMAMURA Y, KITAYAMA H, ALEXANDER DB, IDE CH, HORAN TP, ARAKAWA T, YOSHIDA H, NISHIKAWA S, ITOH Y, SEIKI M, ITOHARA S, TAKAHASHI CH, NODA M. The membrane- anchored MMP inhibitor RECK is a key regulator of extracellular matrix integrity and angiogenesis. *Cell* 2001; **107**: 789–800.
- [27] PALOSAARI H. Matrix metalloproteinases (MMPs) and their specific tissue inhibitors (TIMPs) in mature human odontoblasts and pulp tissue. The regulation of expression of fibrillar collagens, MMPs and TIMPs by growth factors, transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) and bone morphogenetic protein-2 (BMP-2). University of Oulu, Oulu Finland 2003.
- [28] PARKS WC, MECHAM RP. Matrix Metalloproteinases. Academic Press, New York: 1998.
- [29] PELLIKAINEN JM, ROPPONEN KM, KATAJA VV, KELLOKOSKIJK, ESKELINEN MJ, KOSMA VM. Expression of matrix metalloproteinase MMP-2 and MMP-9 in breast cancer with a special reference to activator protein-2, HER2 and prognosis. *Clinical Cancer Res* 2004; **10**: 7621–7628.
- [30] RAY JM, STETLER-STEVENSON WG. The role of matrix metalloproteinases and their inhibitors in tumor invasion, metastasis and angiogenesis. *Eur Respir J* 1994; **7**: 2062–2072.
- [31] ROEB E, SCHLEINKOFER K, KERNEBECK T, POTTSCH S, JANSEN B, BEHRMANN I, MATERN S, GROTZINGER J. The matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) hemopexin domain is a novel gelatin binding domain and acts as an antagonist. *J Biol Chem* 2002; **277**: 50326–50332.

- [32] SAKORAFAS GH, TSIOTOU AG. Genetic predisposition to breast cancer: a surgical perspective. *Br J Surg* 2000; **87**: 149–162.
- [33] SAWICKI G, RADOMSKI M. Nowe aspekty biologii metaloproteinaz przestrzeni międzykomórkowej (MMPs). *Diagn Lab* 1999; **35**: 373–380.
- [34] SHEU BC, HSU SM, HO HN, LIEN HC, HUANG SC, LIN RH. A novel role of metalloproteinases in cancer-mediated immunosuppression. *Cancer Res* 2001; **61**: 237–242.
- [35] SINGER CHF, KRONSTEINER N, MARTON E, KUBISTA M, CULLEN KJ, HIRTENLEHNER K, SEIFERT M, KUBISTA E. MMP-2 and MMP-9 expression in breast cancer-derived human fibroblasts is differentially regulated by stromal-epithelial interactions. *Breast Cancer Res Treat* 2002; **72**: 69–77.
- [36] SINGH S, BARRETT J, SAKATA K, TOZER RG, SINGH G. ETS proteins and MMPs: partners in invasion and metastasis. *Curr Drug Targets* 2002; **3**: 359–367.
- [37] STACHURA J, DOMAGAŁA W. Patologia znaczy słowo o chorobie. t. 1 Patologia Ogólna, PAUWL, Kraków 2003.
- [38] STERNLICHT MD, WERB Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Ann Rev Cell Dev Biol* 2001; **17**: 463–516.
- [39] TALVENSAARI-MATTILA A, PÄÄKKÖ P, BLANCO-SEQUEIROS G, TURPEENNIEMI-HUJANEN T. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) is associated with the risk for a relapse in postmenopausal patients with node-positive breast carcinoma treated with antiestrogen adjuvant therapy. *Breast Cancer Res Treat* 2001; **65**: 55–61.
- [40] TAO Y, MAEGAWA H, UGIS, IKEDA K, NAGAI Y, EGAWA K, NAKAMURA T, TSUKADA S, NISHIO Y, MAEDA S, KASHIWAGI A. The transcription factor AP-2 β causes cell enlargement and insulin resistance in 3T3- L1 adipocytes. *Endocrinology* 2006; **147**: 1685–1696.
- [41] WANG Z, JUTTERMANN R, SOLWATY PD. TIMP-2 is required for efficient activation of proMMP-2 *in vivo*. *J Biol Chem* 2000; **275**: 26411–26415.
- [42] WERB Z. ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology. *Cell* 1997; **91**: 439–442.
- [43] XU J, RODRIGUEZ D, PETITCLERC E, KIM JJ, HANGAI M, YUEN SM, DAVIS GE, BROOKS PC. Proteolytic exposure of a cryptic site within collagen type IV is required for angiogenesis and tumor growth *in vivo*. *J Cell Biol* 2001; **154**: 1069–1079.
- [44] ZAMAN K, DRISCOLL R, HAHN D, WERFFELIP, GOODMAN S.L, BAUER J, LEYVRAZ S, LEJEUNE F, STUPP R, RÜEGG C. Monitoring multiple angiogenesis- related molecules in the blood of cancer patients shows a correlation between VEGF-A and MMP-9 levels before treatment and divergent changes after surgical vs. conservative therapy. *Int J Cancer* 2005; **118**: 775–764.
- [45] Krajowy Rejestr Nowotworów Centrum Onkologii – Instytut im. Marii Curie-Skłodowskiej. <http://85.128.14.124/krn>.

Redaktor prowadzący – Janusz Kubrakiewicz

Otrzymano: 29.05. 2006 r.

Przyjęto: 11.09. 2006 r.

ul. Medyczna 9, 30- 688 Kraków

e-mail: alapka@cm-uj.krakow.pl.